

# ТРАНСГЕННА МОДЕЛЬ МИШЕЙ З ХВОРОБОЮ ШАРКО-МАРІ-ТУТА ТИПУ 1А

М. Ю. Тимчишин<sup>1, а</sup>, В. В. Рубцов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,  
Фізико-технічний інститут

<sup>2</sup> Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»  
Київського національного університету ім. Тараса Шевченка

## Анотація

Дана робота присвячена дослідженню хвороби ШМТ1А на прикладі трансгенних мишей. А саме, дослідження структурних особливостей периферичних нервів, проведення морфометричного аналізу мієлінізованих аксонів за допомогою електронного та світлового мікроскопів. Досліджені трансгенні миші з додатковими копіями RMP22 мають такі клінічні відхилення: демієлінізацію нервових тканин периферичної системи, м'язову атрофію та аномалії ходи. Ми очікуємо, що модель мишей ШМТ полегшить ідентифікацію механізму клітинної хвороби і допоможе оцінити потенційні стратегії лікування.

**Ключові слова:** хвороба Шарко-Марі-Тута, RMP22, клінічні відхилення, демієлінізація

## Вступ

Нормальне функціонування периферичної нервової системи відбувається тільки за наявності мієлінової оболонки, що вкриває аксони та утворюється клітинами Шванна. Ці вузькоспеціалізовані гліальні клітини огортають нервові тканини багатьма шарами мієліну, що сприяє швидкому поширенню імпульсів уздовж аксона.

Найбільш поширені нейрологічні хвороби, в яких порушується функціонування периферичної нервової системи – периферичні нейропатії. Ці порушення відбуваються внаслідок різних причин. Наприклад, діабет і алкоголізм часто викликають набуті нейропатії. Менш поширеними є спадкові нейропатії [2], що визначаються мутаціями одного гена. Серед них і хвороба Шарко-Марі-Тута (ШМТ), також відома як спадкова моторно-сенсорна нейропатія, діагностується з частотою у 40 захворюваних на 100 тис. населення. Із цієї статистики видно, що дана хвороба є дуже розповсюдженою. На сьогоднішній день не існує методів для її повноцінного лікування.

Мета даної роботи – за результатами серії експериментів запропонувати ефективні стратегії лікування.

## 1. Опис хвороби ШМТ типу 1А

Хвороба Шарко-Марі-Тута (ШМТ типу 1А) є найбільш поширеною спадковою нейропатією у людей і пов'язана з дуплікацією великої ділянки короткого плеча 17-ї хромосоми (17p11.2), довжиною  $1.5 \times 10^6$  bp (base pair – базові блоки ДНК). Ця ділянка несе в собі ген RMP22 (кодує білок периферичного мієліну розміром 22 kDa). Він входить до складу мі-

єлінової оболонки периферичних нервових волокон. Внаслідок дуплікації збільшується кількість виробленого білка RMP22, що призводить до структурних та функціональних порушень мієлінової оболонки.

Частота захворювань саме на ШМТ1А складає 60–70% від всіх існуючих форм ШМТ. Ця форма має аутосомно-домінантний тип наслідування. Повільно прогресуюча хвороба, зазвичай, починається в ногах, проявляється в перші два десятиліття життя. Пацієнти з класичним фенотипом ШМТ мають такі відхилення: слабкість і атрофія дистальних м'язів, втрата сенсорності, гіпорексія і деформація скелета. Тривалість життя не скорочується і пацієнти зазвичай залишаються амбулаторними протягом усього життя, хоча часто потребують ортопедичної діяльності [2].

## 2. Зниження швидкості нервової провідності при ШМТ1А

Характерною рисою ШМТ1 є зниження швидкості провідності (NCV) в периферичних нервах. RMP22-трансгенні щури досліджувалися у віці 2.5 місяців і показали істотне зменшення провідних властивостей як моторних, так і сенсорних нервів (рис. 1.(А)). Збільшилася затримка складних моторних (рухових) потенціалів дії (СМАР), що вплинуло на швидкість провідності моторного нерва, яка складає  $14.7 (\pm 5.1)$  м/с у трансгенних щурів, порівняно з  $36.4 (\pm 2.5)$  м/с у диких типів [1]. Окрім уповільнення NCV, була знижена амплітуда СМАР від дистальної стимуляції. Були заміряні сенсорні потенціали дії нервів (SNAP), їх NCV було також зменшено до  $14.9 (\pm 7.2)$  м/с у трансгенних щурів та  $34.5 (\pm 4.0)$  у дикого типу.

<sup>а</sup>nicktymch@gmail.com

Table 1. Reduced Nerve Conduction Velocities in PMP22-Transgenic Rats

	Wild type	PMP22-Transgenic
Motor latency (ms)		
Proximal stimulation	3.3 ( $\pm 0.1$ )	10.3 ( $\pm 4.5$ ) <sup>a</sup>
Distal stimulation	1.8 ( $\pm 0.2$ )	5.3 ( $\pm 1.8$ ) <sup>a</sup>
Motor conduction velocity (m/s)	36.4 ( $\pm 2.5$ )	14.7 ( $\pm 5.1$ ) <sup>a</sup>
CMAP amplitude (mV)		
Proximal stimulation	6.4 ( $\pm 2.0$ )	0.7 ( $\pm 0.4$ ) <sup>a</sup>
Distal stimulation	11.3 ( $\pm 4.0$ )	1.4 ( $\pm 1.2$ ) <sup>a</sup>
Sensory latency (ms)		
Distal stimulation	1.8 ( $\pm 0.2$ )	4.6 ( $\pm 2.2$ ; n = 2) <sup>b</sup>
Sensory conduction velocity (m/s)	34.5 ( $\pm 4.0$ )	14.9 ( $\pm 7.2$ ; n = 2) <sup>b</sup>
SNAP amplitude ( $\mu$ V)	5.7 ( $\pm 3.8$ )	2.0 (0; n = 2) <sup>b</sup>

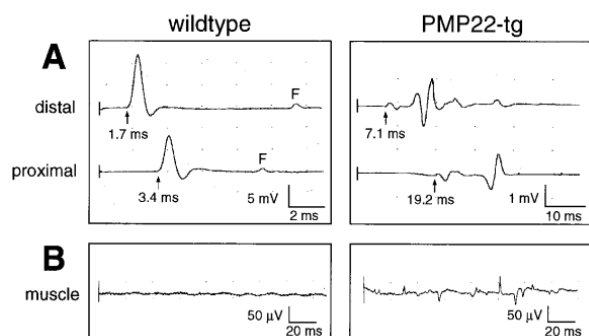


Рис. 1. (А) Графіки потенціалу дії (СМАР) м'язу стопи після проксимальної та дистальної стимуляції; (В) Графіки показань ЕМГ

Таким чином, зниження NCV були схожі з результатами у пацієнтів з ШМТ1А.

Виміри були проведені на відстані 40 мм від стимулюючого електроду і показали характерну десинхронізацію СМАР (поліфазія) у трансгенних щурів[1]. Незважаючи на мінімальні морфологічні ознаки дегенерації аксонів РМР22-трансгенних щурів, записи ЕМГ (рис. 1.(В)) з м'язів стоп виявили велику кількість фібриляційних потенціалів, що свідчить про часткову денервацію м'язів.

### 3. ШМТ1А-тваринні моделі

Трансгенні миші під назвою Trembler ("тримтячі") є носіями точкових мутацій в гені РМР22 та мають паталогічні особливості як і у хвороби ШМТ [5]. Дійсно, однакова мутація була виявлена як у мишей, так і у людей. Однак, субклітинні наслідки неправильного фолдинга гена РМР22 і його надмірної експресії (у більшості випадків ШМТ1А) різні. Тож у даному контексті тваринні моделі даних мишей не співпадають з моделями для захворювань ШМТ у людей. Надекспресія гену РМР22 дикого типу може бути змодельована тільки додатковими трансгенними копіями цього гена.

Трансгенні тварини утворюються шляхом додавання очищених фрагментів ДНК або більших геномних фрагментів у запліднені яйцеклітини. Це стандартна процедура для мишей, але для щурів та інших видів вона є більш технологічно вимогливою. Рекombінація

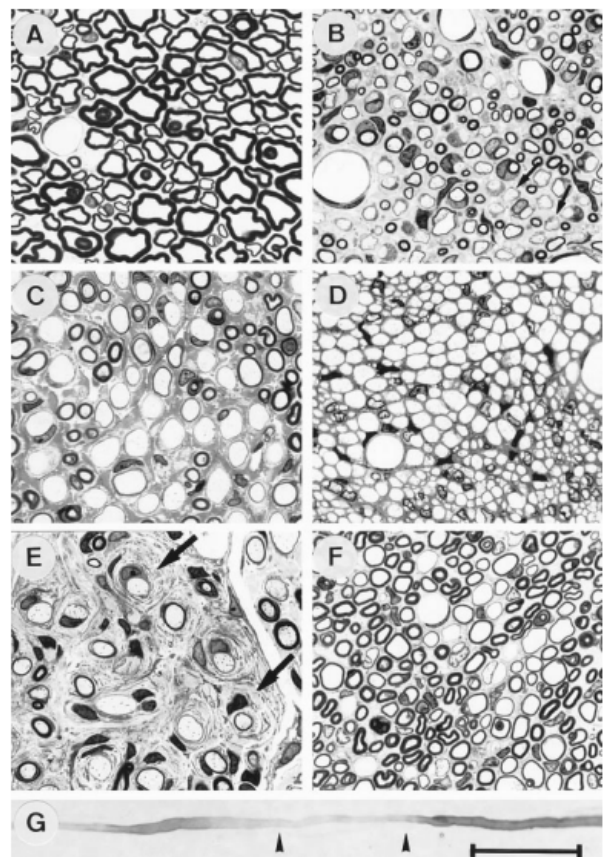


Рис. 2. (А) Ділянка (1 мм) сідничного нерва щура дикого типу. (В) Гетерозиготний РМР22-трансгенний щур, віком 5 тижнів. Частина аксонів (стрілки) не мають мієлінових оболонок, деякі мають тонкий мієлін, а інші оболонки – нормальні за товщиною. (С) Гетерозиготний РМР22-трансгенний щур, віком 6 місяців. Більш великі за діаметром аксони не мають мієлінової оболонки, тоді як більшість малих аксонів мають нормальну товщину оболонки. (D) Гомозиготний трансгенний щур, віком 5 тижнів. Мієлін відсутній. (Е і F) Порівняння аномалій вентральних (Е) і дорсальних (F) нервових коренів гетерозиготного щура у віці 6 місяців. (G) Волокно сідничного нерва 2.5-місячного гетерозиготного щура

клонованої ДНК в геном господаря є випадковою. Як правило, процес інтеграції створює кілька копій менших фрагментів трансгену, які потім знаходяться в тандемній орієнтації "head-to-tail".

Моделі РМР22 трансгенних тварин були створені як для щурів, так і для мишей [4][6]. ШМТ-подібний фенотип цих гризунів був першим прямим доказом того, що у людини РМР22 є відповідальним геном за захворювання в межах дуплікованого регіону[3].

### 4. Периферична гіпомієлінізація РМР22-трансгенних щурів

Морфологічний аналіз показав втрату мієліну в периферичних і черепних нервах. У поперечних перерізах сідничних нервів багато аксонів мали тонкі мієлінові оболонки [1] (рис. 2.А – С).

Ступінь гіпомієлінізації відрізнялася між індивідуумами і корелювала з видимим фенотипом [1]. До

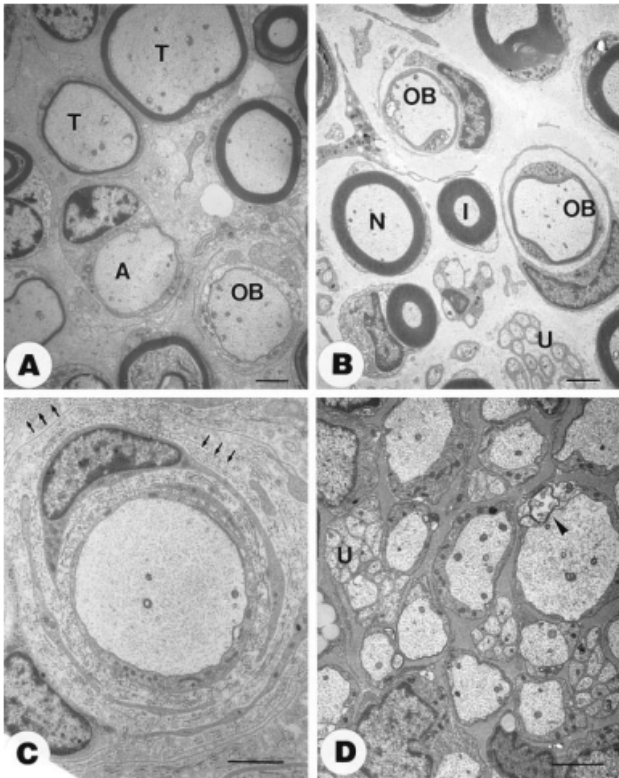


Рис. 3. (А) Гетерозиготний трансгенний щур у віці 2.5 місяця. Аксони мають або непропорційно тонкі мієлінові оболонки (Т), або не мають мієлінових оболонок (А). (В) Гетерозиготний трансгенний щур віком 6 місяців. Одне волокно (N) має мієлінову оболонку нормальної товщини, тоді як два невеликі аксони мають непропорційно збільшену товщину мієліну (I). (С) Типова цибулина 6-місячного щура. Показані концентричні шари Шваннівської клітини і надлишкові базальні пластинки навколо голого аксона. (D) Гомозиготний трансгенний щур віком 5 тижнів. Аксони оточені цитоплазмою Шваннівської клітини, але жодна з них не має мієлінової оболонки. Немієліновані волокна (U) є нормальними. Усі шкали довжиною 2  $\mu\text{m}$ .

6-місячного віку цибулини були великими (рис. 2.А). Тяжкість аномалій була більшою у коренях вентральних нервів у порівнянні з дорсальними коренями (рис. 2.Е і F) або дистальними сідничними і великогомілковими нервами. Вентральна/дорсальна різниця все ще відбивалася на периферії, оскільки нерви, які є переважно моторними, були більш сильно уражені, ніж ті, які є переважно сенсорними (наприклад, дистальними великогомілковими нервами).

Загалом, гіпомієлінізація була більш виражена в волокнах більшого діаметру (імовірно, моторних), в той час як набагато дрібніші волокна мали оболонки нормальної або навіть підвищеної товщини (рис. 2.С). Дефіцит мієліну варіювався впродовж окремих волокон (сегментарна демієлінізація), навіть в межах одного міжвузля (рис. 2.Г). Мієлінові оболонки добре ущільнені з нормальною періодичністю. Кількість ендоневрального колагену збільшувалася. Аксональна дегенерація була рідкісним явищем, в якому брали участь менше 1% волокон. У су-

купності морфологічні аномалії RMP22-трансгенних щурів дуже нагадують патологію хворої людини з СМТ1А

## 5. Методика проведення дослідів

Дослідження трансгенних мишей було поділено на три етапи:

### 1) Проведення поведінкових тестів

- якісно описати поведінку трансгенних тварин
- показати як залежить поведінка кожної групи мишей від ступеня демієлінізації нервових волокон.

### 2) Проведення морфометричного аналізу мієлінізованих аксонів n. medianus (передня кінцівка), n. peroneus та n. tibialis (задня кінцівка). При цьому будуть вимірюватись:

- діаметр мієлінізованих волокон;
- кількість мієлінізованих волокон в досліджуваних нервах;
- кількість немієлінізованих волокон в досліджуваних нервах;
- товщина мієлінової оболонки волокон;
- кількість шарів мієліна, обертаючих волокно;
- співвідношення мієлінізованих і немієлінізованих волокон в досліджуваних нервах;
- стан цитоскелетного апарату як мієлінізованих, так і немієлінізованих нервів (кількість та діаметр нейротубул);
- діаметр і стан аксоплазми волокон.

### 3) Проведення електрофізіологічних тестів, визначення таких параметрів:

- швидкість провідності мієлінізованих волокон
- швидкість провідності немієлінізованих волокон
- залежність швидкості провідності від статі миші
- порівняння отриманих результатів з відомими значеннями провідності

Морфометричний аналіз буде проводитись виключно на гомозиготних особинах, оскільки в них найбільш виражений перебіг хвороби. Буде досліджуватися 5 груп тварин: 1-а група звичайний дикий тип (контрольна група). Інші 4 групи — трансгенні.

Проведення морфометричного аналізу наразі не є доцільним, оскільки очікуються результати секвенування зразків, що покаже гомозиготна чи гетерозиготна по RMP22 кожна піддослідна миша. Для здійснення статистично достовірного морфометричного аналізу у кожній групі повинно бути не менше 3-х тварин. Таким чином буде потрібно 15 тварин (3 – звичайні, 12 – трансгенні). Для того, щоб накопичити достатню кількість гомозиготних мишей (12 особин) в одному поколінні, потрібно отримати декілька проміжних поколінь. Слід продовжувати розплід тварин доки їх кількості не буде достатньо.

## 6. Результати

У 2-місячному віці гетерозиготні трансгенні миші розвивають нестійку ходу і проявляють ознаки м'язової слабкості. Коли випрямляються, вони часто не втримують вагу свого тіла на розтягнутих задніх кінцівках. Атрофія м'язів задніх кінцівок більш очевидна у старих особин.

Аналіз слідів виявив, що гетерозиготні миші показують незграбність та незручність при ходьбі. Розташування слідів задніх лап має невелике зовнішнє зміщення, при цьому картина дикого типу трохи відрізняється від трансгенного.

Гомозиготні RMP22-трансгенні миші більш сильно уражені, ніж гетерозиготні, вони відстають у рості і ніколи не навчаться контролювати рухи кінцівок. Іноді зустрічаються миші з епізодами спастичності і паралегії.

## Висновки

Було досліджено покоління гомозиготних по RMP22 мишей. У ході роботи були виявлені та описані їх поведінкові особливості. Як і очікувалося, ступінь демієлінізації однозначно впливає на незграбність ходи мишей та ступінь атрофії їх м'язів.

На даний момент очікуються результати секвенування ДНК (встановлення послідовності нуклеоти-

дних основ ДНК), що має виявити гомозиготність піддослідних тварин. Це дозволить провести морфометричний аналіз аксонів для встановлення структурних характеристик мієлінізованих нервових волокон.

## Перелік використаних джерел

1. Michael Sereda, Ian Griffiths, Anja Puhlhofer. A Transgenic Rat Model of Charcot-Marie-Tooth Disease — 1996.
2. Ágnes Patzko, Michael E. Shy. Update on Charcot-Marie-Tooth Disease — 2011.
3. M. W. Sereda, K. A. Nave. Animal Models of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A — 2006.
4. Huxley C., Passage E., Robertson A. M. Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. — 1998.
5. Suter U., Welcher A. A., Ozcelik T. Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene.— 1992.
6. Sereda M. W., Meyer zu Horste G., Suter U., Uzma N., and Nave K. A. Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT1A) — 2003.